

*Cryptococcus neoformans* é uma levedura patogênica que acomete principalmente indivíduos imunocomprometidos. O principal fator de virulência deste patógeno é a produção de uma cápsula polissacarídica que possui propriedades imunomodulatórias. O componente majoritário da cápsula é a glicuronoxilomanana (GXM), a qual é secretada para o meio extracelular através de vesículas e reincorporada a superfície da célula. Vias de secreção não convencional de GXM dependem da ação da proteína GRASP (*golgi reassembly and stacking protein*) em *C. neoformans*. Trabalhos recentes do nosso grupo demonstram que mutantes nulos de *C. neoformans* para o gene que codifica GRASP apresentam virulência atenuada e cápsula reduzida. O objetivo do presente trabalho é avaliar a localização subcelular de GRASP. Para tal, primeiramente utilizamos a estratégia de purificação da proteína GRASP recombinante em modelo de expressão heteróloga em *Escherichia coli*. A proteína GRASP recombinante foi utilizada para produção de anticorpos, os quais serão utilizados em ensaios de localização subcelular desta proteína em *C. neoformans*. Oligonucleotídeos foram projetados para a amplificação do cDNA de GRASP, o qual foi posteriormente clonado no vetor pCR2.1-TOPO. Este foi subclonado em vetor de expressão procariótico pET23d. Após clonagem, o vetor pET23d::GRASP foi transformado por eletroporação em células de *E. coli* linhagem BL21(DE3). A purificação da proteína GRASP recombinante, fusionada a uma cauda de histidinas foi realizada por cromatografia de afinidade a níquel imobilizado. Após obtenção da proteína recombinante purificada procedemos às imunizações de camundongos BALB/c. Foram realizadas três etapas de imunização com 20µg ou 100µg de proteína recombinante, com intervalos de 15 dias. Alíquotas de soro dos camundongos foram coletadas para purificação de IgG. Esta etapa de purificação foi realizada com o Kit *Montage Antibody Purification* (Millipore) conforme instruções do fabricante e posteriormente este foi avaliado por ELISA e *Western Blot*. A produção de anticorpos anti-GRASP será fundamental para ensaios de localização desta proteína por imunofluorescência em *C. neoformans* visando à elucidação de novas vias de secreção não convencional neste patógeno.